

## ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 616.98:578.828.6

**А.В. Бондаренко, С.І. Похил\*, О.В. Бондаренко\*,  
В.М. Козько, Д.В. Кацапов**

*Харківський національний медичний університет*

*\*ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова» АМН України,  
м. Харків*

**ДОСЛІДЖЕННЯ КУЛЬТУРАЛЬНИХ  
І АНТАГОНІСТИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ *BARTONELLA SPP.***

Наведено результати власних досліджень культуральних і антагоністичних властивостей *Bartonella spp.* Встановлено їх високу вибагливість до поживних середовищ і умов культивування. Ефективними для виділення і вирощування штамів *Bartonella spp.* є різні варіанти оптимізованого шоколадного агару, які виготовляли на основі середовищ LBA, EA, BHIA та дефібринованої крові кролика або барана. У тестах відстроченого антагонізму не було виявлено жодного випадку антагоністичної взаємодії *Bartonella spp.* з іншими видами бактерій.

**Ключові слова:** *Bartonella*, культуральні властивості, антагоністичні властивості.

Незважаючи на те, що клініка типової форми хвороби від котячої подряпини вперше була описана у 1931 р., збудник був ідентифікований у 1990 р. і лише у 1993 р. після вивчення будови рибосомальної РНК отримав назву *Bartonella henselae*. Дотепер бартонели вважаються маловивченою групою мікроорганізмів. Сьогодні ці бактерії об'єднані в родину *Bartonellaceae*, яка містить один рід *Bartonella* та 24 види й підвиди. Кількість видів бартонел і в подальшому буде швидко зростати, бо існує велика кількість різновидів тварин, птахів, земноводних та інших істот, які можуть бути господарями для паразитуючих бартонел [1–3]. Тому є очевидною актуальність вивчення культуральних властивостей *Bartonella spp.* для бактеріологічної діагностики бартонельозів.

Антагоністична активність бактерій в асоціаціях є однією із форм боротьби за існування – результат взаємодій між мікроорганізмами, що визначає їх виживання. Активний штам виконує роль продуцента антимікробних речовин, а асоціативні бактерії визначають можливість і силу прояву антагонізму [4]. Виявлення антагоністич-

них властивостей *Bartonella spp.* може стати важливим ідентифікаційним критерієм.

**Матеріал і методи.** Об'єктом дослідження були дев'ять штамів бактерій роду *Bartonella*. В якості типового використовували штам *Bartonella henselae* CCUG 30454BT, отриманий із Culture Collection, University of Goeteborg, Department of Clinical Bacteriology. Всім інших референтних штамів *Bartonella spp.* (JHMI3 06U051, 06U052, 06U053, 06U054, 06U055, 06U056, 06U061, 06U062) були виділені в 2005–2006 рр. в лабораторії нових і маловивчених інфекційних захворювань ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова» від хворих на бартонельозну інфекцію, які проходили лікування в обласній клінічній інфекційній лікарні м. Харкова.

Тестовані такі поживні середовища: 2%-вий м'ясопептонні агар і бульйон, середовище для визначення антибіотикочутливості, 2%-вий агар із мозково-серцевим екстрактом, Лурія-Бертані агар і бульйон, буферний вугільно-дріжджовий агар, середовища для виділення і культивування бруцел – еритрит-агар, бордетел-козеїно-вугільний агар, стафілококів – молочно-жовт-

© А.В. Бондаренко, С.І. Похил, О.В. Бондаренко та ін., 2011

ково-сольовий агар, гемокультур і стрептококів, мікроорганізмів роду *Candida* – агар Сабуро, ентеробактерій – агар Ендо, сальмонел – вісмут-сульфіт-агар, шигел – агар Плоскірева, нейсерій та корінебактерій – сироватковий агар, культивування молочнокислих бактерій – молочно-рослинне середовище – 4,5%-ий кров'яний агар, шоколадний агар, виготовлений за традиційною рецептурою, та оптимізовані варіанти шоколадного агару, які виготовляли на основі середовищ Лурія-Бертані агар і бульйон, еритрит-агар, 2%-ий агар із мозково-серцевим екстрактом та дефібринованої крові кролика або барана [5].

Усі поживні середовища виготовляли за загальноприйнятими рецептурами, як викладено в інструкціях підприємств-виробників середовищ і нормативно-методичних документах. Якість поживних середовищ оцінювали у відповідності із загальними бактеріологічними вимогами [6–8]. Окрім оптимальних показників рН, Eh, ізотонічності, вологості, достатньої буферності та стерильності, які забезпечувалися чітким дотриманням визначеної технології приготування, поживні середовища тестували на ростові якості: наявність і кількість колонієутворюючих одиниць (КУО); швидкість росту бартонел – час культивування, необхідний для формування макроколоній, видимих неозброєним оком; характеристику фенотипів макроколоній бартонел; збереження типових мікробіологічних властивостей у штамів бартонел, вирощених на поживних середовищах: морфологічних, тинкторіальних, біохімічних, серотипічних. Стандартизовані у стерильному 0,15 М фосфатно-сольовому буфері (рН=7,0) до 0,023 за показником одиниць оптичної щільності при  $\lambda=590$  нм суспензії штамів бартонел дозовано (по  $10^{-1}$ – $10^{-4}$  мл) висівали на поверхню поживних середовищ. Культивування посівів бартонел здійснювали при температурі  $(35,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  в атмосфері з 5%-вим  $\text{CO}_2$  впродовж 10–40 діб із щодобовим переглядом зон росту мікроорганізмів (для створення необхідних умов використовували ексікатор) [9, 10].

Антагоністичні властивості штамів *Bartonella spp.* по відношенню до культур інших видів бактерій, які найчастіше спричиняють гнійно-запальні ускладнення ран (у тому числі після укусів, подряпин шкіри, нанесених тваринами), – *Staphylococcus aureus subsp. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneu-*

*moniae subsp. pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Actinomyces israelii*, *Pasteurella multocida* (штами отримано із музею живих культур ІМІ ім. І.І. Мечникова) вивчали за допомогою методу відстроченого антагонізму [11], а також прискореним тестом з нанесенням поверхневого шару агару, інокульованого індикаторною культурою. Прискорений тест з нанесенням поверхневого шару агару передбачає попереднє вирощування на поживному середовищі в чашках Петрі макроколоній мікроорганізмів, які тестуються для виявлення їх здатності конкурентно пригнічувати ріст інших видів бактерій. В подальшому готується другий верхній шар напівтвердого поживного середовища (містить 0,7%-ий (вага/об'єм) поживний агар) з індикаторним штамом, за характеристиками росту якого виявляли ознаки антагоністичного пригнічення. Для цього в розплавлене і охолоджене до  $46$ – $48^\circ\text{C}$  напівтверде поживне середовище (розлили в стерильні пробірки по 3–4 мл) вносили 0,1 мл однодобової бульйонної культури або корпускулярної суспензії в стерильній дистильованій воді індикаторного штаму в концентрації 0,045–0,050 од. опт. щільн. при  $\lambda=590$  нм, що складало приблизно  $10^8$ – $10^9$  КУО/мл та 0,01 % (вага/об'єм) окисновідновного ( $\text{RH}_2$ ) індикатора, 2,3,5-трифенілтетразолію хлористого ( $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{Cl}$ ) – ТТХ. Чашки із нанесеною індикаторною культурою інкубували при  $(35,0 \pm 0,5)^\circ\text{C}$  (в атмосфері з 5%-вим  $\text{CO}_2$ , коли індикаторними штамми були *Bartonella-like* мікроорганізми) від 5 до 72 год для формування чітких ознак їх пригнічення або активного росту. За цих умов зони поживного середовища із наявністю бактеріального росту набувають яскраво-червоного забарвлення, а зони пригнічення індикаторного штаму зберігають вихідний колір. Незабарвлена окислена форма ТТХ під дією продуктів життєдіяльності мікроорганізмів переходить у відновлену форму – 2,3,5-трифенілформазан. Прискорений тест з нанесенням поверхневого шару агару дозволяє суттєво прискорити результати досліджень антагоністичних властивостей штамів мікроорганізмів [12].

Для виготовлення поживних середовищ і вирощування *Bartonella spp.* і мікроорганізмів інших таксономічних груп використовували типове для бактеріологічних лабораторій обладнання, прилади і лабораторний посуд: стерилізатор ВК-75, сушильно-

стерилізаційну шафу ШСС-80П, центрифугу ОПН-ЗУХЛ42, прилад для рахування колоній бактерій «ПСБ», мікроскоп С-11 серії «Біолам», рН-метр-мілівольтметр рН-410, колориметр фотоелектричний концентраційний КФК-2МП-УХЛ, аквадистилатор ДЕ-42 модель 818, ваги технічні ВЛТ-1000, термостат електричний сухоповітряний ТС-80М-2, холодильник побутовий «Снайге» та ін.

**Результати та їх обговорення.** Бартонелли характеризуються високою вибагливістю до поживних середовищ і потребують особливих умов для культивування. Типовий штам *B. henselae* CCUG 30454BT і виділені штами *Bartonella spp.* не росли (не формували впродовж 40 діб вирощування при оптимальних умовах макроколоній, видимих неозброєним оком) на переважній більшості поживних середовищ, які найбільш широко застосовуються в практиці бактеріологічних лабораторій установ охорони здоров'я України. На кров'яному агарі типовий штам *B. henselae* давав слабкий ріст з утворенням дрібних макроколоній. Останні стають ледь видимими неозброєним оком лише на 8-му–10-ту добу вирощування, а впродовж 14 діб інкубування досягають розмірів 0,5–0,8 мм в діаметрі, мають атипові фенотипічні характеристики: практично правильну округлу форму, трохи випуклий профіль, ледь шорстку або гладку поверхню, чіткий рівний або нерівний край (SR-форма), напівпрозорий сіруватий колір. Навпаки, жоден з клінічних штамів *Bartonella spp.* при цих умовах культивування не утворював видимих неозброєним оком макроколоній на кров'яному агарі. Всі досліджені нами штами бартонел давали задовільний ріст (формували видимі неозброєним оком макроколонії на 12-ту–16-ту добу інкубування) на традиційному шоколадному агарі.

Для вирощування культур *Bartonella spp.* більш ефективним виявився оптимізований шоколадний агар, який характеризується задовільною технологічністю при виготовленні, добре стандартизується за наступними показниками: активністю іонів водню (показник рН становив  $7,0 \pm 0,1$ ; окисно-відновлювальним (редокс) потенціалом (показник Eh змінювався від -120 мВ до -30 мВ); вологістю ( $\alpha_w$  – показник активності води в середовищі становив  $0,97 \pm 0,01$ , його оптимальне значення вдається утримувати впродовж тривалої інкубації посівів в умовах вологості камери при використанні

ексикатора) і осмотичним тиском ( $\pi$  – розрахований показник осмотичного тиску середовища складав 2875 кПа/моль).

Зразки оптимізованого шоколадного агару, виготовлені на основі Лурія-Бертані агару і бульйону, еритрит-агару і 2%-вого агару із мозково-серцевим екстрактом, забезпечили ріст усіх дев'яти штамів *Bartonella spp.*, взятих в експеримент, при цьому в стандартних умовах культивування видимі неозброєним оком макроколонії формуються на 7-му або 9-ту добу, а масова частка макроколоній з типовою морфологією складає близько 85 %.

При вирощуванні типового штаму *B. henselae* на оптимізованому шоколадному агарі видимі неозброєним оком макроколонії формуються впродовж семи діб, а за 10 або 12 діб досягають розмірів 0,8–1,4 мм в діаметрі, мають наближену до правильної округлу форму, випуклу шорстку блискучу поверхню (напівсферу) з чітким рівним краєм (S-форма), напівпрозорий сіруватий колір. Клінічні штами *Bartonella spp.* при вирощуванні на оптимізованій шоколадній агар характеризувались значною політипністю морфології колоній. Останні відрізнялись від макроколоній типового штаму *B. henselae* CCUG 30454BT більш виразною шорсткістю (SR-форма) з чітким, нерівним краєм і горбкуватою поверхнею, яка схожа на голівку «кольорової капусти».

За результатами експериментів, у тестах відстроченого антагонізму не було виявлено жодного випадку антагоністичної взаємодії між штамами культур *S.aureus subsp. aureus*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *E. coli*, *S. pyogenes*, *P. multocida*, *C. albicans*, *A. israelii* та культурами *Bartonella spp.* Штами бартонел формують типові макроколонії при їх вирощуванні на оптимізованій шоколадній агарі за умови безпосередньої близькості до макроколоній інших мікроорганізмів указаних таксономічних груп.

#### Висновки

1. Дослідження культуральних властивостей штамів бартонел засвідчили, що ці мікроорганізми характеризуються високою вибагливістю до поживних середовищ і умов культивування. Вони не ростуть на більшості поживних середовищ, які широко застосовуються в практиці бактеріологічних лабораторій установ охорони здоров'я України.

2. Доведено, що у порівнянні із традиційним шоколадним агаром більш ефектив-

ними для виділення і вирощування штамів *Bartonella spp.* є різні варіанти оптимізованого шоколадного агару, на яких при вирощуванні впродовж 5–10 діб ці мікроорганізми формують типові (SR-форма) і атипові (S-форма) макроколонії розміром 0,8–1,4 мм в діаметрі.

3. Встановлено, що клінічні штами бартонел при вирощуванні на оптимізованому шоколадному агарі характеризуються знач-

ною політипністю морфології колоній і відрізняються від макроколоній типового штаму *B. henselae* CCUG 30454BT більш виразною шорсткістю, чітким, нерівним краєм і горбкуватою поверхнею, яка схожа на голівку «кольорової капусти».

4. При вивченні антагоністичних властивостей *Bartonella spp.* в тестах відстроченого антагонізму не було виявлено жодного випадку антагоністичної взаємодії.

### Список літератури

1. Isolation of *Bartonella* (*Rochalimaea*) *henselae*: effects of methods of blood collection and handling / S. A. Brenner, J. A. Rooney, P. Manzwetsch, R. L. Regnery // *J. Clin. Microbiol.* – 1997. – № 35. – P. 544–547.
2. *Jacomo V.* Natural history of bartonella infections (an exception to Koch's postulate) / V. Jacomo, P. J. Kelly, D. Raoult // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* – 2002. – № 9. – P. 8–18.
3. *La Scola B.* Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998) / B. La Scola, D. Raoult // *J. Clin. Microbiol.* – 1999. – Vol. 37. – P. 1899–1905.
4. Ассоциативный симбиоз / О. В. Бухарин, Е. С. Лобакова, Н. В. Немцева, С. В. Черкасов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 264 с.
5. Бактеріологічний метод діагностики бартофельозної інфекції / А. В. Бондаренко, С. І. Похил, О. В. Бондаренко [та ін.] // *Лаб. діагностика.* – 2007. – № 2 (40). – С. 51–56.
6. Приказ МЗ СССР № 535 от 22.04.1985 г. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях. – М., 1985. – 126 с.
7. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / под ред. О. М. Биргера. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медгиз, 1982. – 464 с.
8. Український центр державного санітарно-епідеміологічного нагляду. Інформ. лист № 05.4.1/1670 від 15.11.2000 р. «Бактеріологічний контроль поживних середовищ». – К., 2000. – 13 с.
9. Strategy to detect and identify *Bartonella* species in routine clinical laboratory yields *Bartonella henselae* from human immunodeficiency virus-positive patient and unique *Bartonella* strain from his cat / J. E. Clarridge, T. C. Raich, D. Pirwani [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33, № 8. – P. 2107–2113.
10. Cat scratch disease. Isolation and culture of the bacterial agent / C. K. English, D. J. Wear, A. M. Margileth [et al.] // *J. Am. Med. Assoc.* – 1997. – Vol. 259. – P. 1347–1352.
11. *Кудлай Д. Г.* Бактериоциногенез / Д. Г. Кудлай, В. Г. Лихоед. – Л., 1966. – 203 с.
12. *Похил С. И.* Экспрессный метод бактериоцинотирования микроорганизмов / С. И. Похил, Л. А. Кособуцкий // *Лаб. дело.* – 1991. – № 7. – С. 54–56.

**А.В. Бондаренко, С.И. Похил, Е.В. Бондаренко, В.Н. Козько, Д.В. Кацапов**

### ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ И АНТАГОНИСТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *BARTONELLA SPP.*

Представлены результаты собственных исследований культуральных и антагонистических свойств *Bartonella spp.* Установлена их высокая прихотливость к питательным средам и условиям культивирования. Эффективными для выделения и выращивания штаммов *Bartonella spp.* являются различные варианты оптимизированного шоколадного агара, изготавливаемые на основе сред LBA, EA, BHIA и дефибринированной крови кролика или барана. В тестах отсроченного антагонизма не было выявлено ни одного случая антагонистического взаимодействия *Bartonella spp.* с другими видами бактерий.

**Ключевые слова:** *Bartonella*, культуральные свойства, антагонистические свойства.

**A.V. Bondarenko, S.I. Pokhil, O.V. Bondarenko, V.M. Kozko, D.V. Katsapov**

### STUDY OF *BARTONELLA SPP.* CULTURAL AND ANTAGONISTIC PROPERTIES

The results of own researches on *Bartonella spp.* cultural and antagonistic properties are presented. Their high fastidiousness to selective mediums and conditions of cultivation is set. Effective for the selection and growing of cultures of *Bartonella spp.* there are different variants of optimized chocolate agar, produced on the basis of LBA, EA, BHIA mediums and defibrinated blood of rabbit or ram. At the study of *Bartonella spp.* antagonistic properties, not a single case of antagonistic cooperation was exposed on the results of experiments on the tests of deferred antagonism.

**Key words:** *Bartonella*, cultural properties, antagonistic properties.

Поступила 28.03.11